

10/539011

PCT/R 03/01889

RO/KR 23.09.2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0084036
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 12월 26일
Date of Application DEC 26, 2002

출원인 : 주식회사 태평양
Applicant(s) AMOREPACIFIC CORPORATION

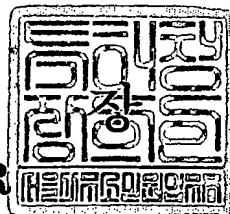
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 09 월 08 일

특 허 청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.12.26
【발명의 명칭】	진세노사이드 화합물 K로 이루어진 히알루론산 생성촉진제
【발명의 영문명칭】	Promoter for the production of hyaluronic acid containing ginsenoside compound K
【출원인】	
【명칭】	주식회사 태평양
【출원인코드】	1-1998-003983-5
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	9-1998-000307-3
【포괄위임등록번호】	2001-033730-9
【대리인】	
【성명】	이선희
【대리인코드】	9-1998-000434-4
【포괄위임등록번호】	2001-033731-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김수정
【성명의 영문표기】	KIM,Sujong
【주민등록번호】	730107-2780714
【우편번호】	449-904
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 보라리 314-1 비전하우스 303호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강병영
【성명의 영문표기】	KANG,Byung-Young
【주민등록번호】	690705-1120819
【우편번호】	137-769
【주소】	서울특별시 서초구 반포4동 미도아파트 308동 1503호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

신의석

【성명의 영문표기】

SHIN, Eui seok

【주민등록번호】

730530-1024521

【우편번호】

449-915

【주소】

경기도 용인시 구성면 언남리 493 하마비마을 동부센트레빌 105동 30 3호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

조시영

【성명의 영문표기】

CHO, Si Young

【주민등록번호】

710220-2481913

【우편번호】

449-905

【주소】

경기도 용인시 기흥읍 상갈리 487-8 204호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

장희경

【성명의 영문표기】

CHANG, Huikyoung

【주민등록번호】

751130-2784023

【우편번호】

449-904

【주소】

경기도 용인시 기흥읍 보라리 314-1 비전하우스 301호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이은희

【성명의 영문표기】

LEE, Eun Hee

【주민등록번호】

760324-2056615

【우편번호】

450-741

【주소】

경기도 평택시 세교동 558 우성아파트 103동 1502호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

성대석

【성명의 영문표기】

SUNG, Dae Seok

【주민등록번호】

730530-1011911

【우편번호】	130-781
【주소】	서울특별시 동대문구 청량리1동 미주아파트 4동 817호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	염명훈
【성명의 영문표기】	YEOM, Myeong Hoon
【주민등록번호】	671025-1251217
【우편번호】	449-755
【주소】	경기도 용인시 수지읍 벽산아파트 101동 902호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	우광식
【성명의 영문표기】	WOE, Kwang Sik
【주민등록번호】	740115-1394631
【우편번호】	380-892
【주소】	충청북도 충주시 신니면 송암리169번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김덕희
【성명의 영문표기】	KIM, Duck Hee
【주민등록번호】	601013-2051117
【우편번호】	137-043
【주소】	서울특별시 서초구 반포3동 한양아파트 2동 902호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이태룡
【성명의 영문표기】	LEE, Tae Ryong
【주민등록번호】	650214-1114216
【우편번호】	442-470
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 태영아파트 932동 1303호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

심영철

【성명의 영문표기】

SIM, Young Chul

【주민등록번호】

540816-1030515

【우편번호】

463-020

【주소】

경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운 삼익아파트 123동 1402호

【국적】

KR

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인

윤동열 (인) 대리인

이선희 (인)

【수수료】

【기본출원료】

19 면 29,000 원

【가산출원료】

0 면 0 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

2 항 173,000 원

【합계】

202,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 위임장[2001년 6월 11일 포괄위임등록]_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 진세노사이드 화합물 K로 이루어진 히알루론산 생성촉진제에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 인삼 사포닌의 주요 대사산물인 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사디올(화합물 K)의 효능, 즉 화합물 K가 인체 세포에 존재하는 히알루론산 합성효소(hyaluronic acid synthase, HAS) 유전자의 발현을 증가시켜 인체세포에서 히알루론산(hyaluronic acid) 생성을 촉진하는 효능이 있음을 밝히고, 이를 함유함으로써 히알루론산의 생성을 촉진하는 기능의 히알루론산 생성촉진제에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

히알루론산*인삼*사포닌*진세노사이드*히알루론산 합성효소*HAS

【명세서】

【발명의 명칭】

진세노사이드 화합물 K로 이루어진 히알루론산 생성촉진제 {Promoter for the production of hyaluronic acid containing ginsenoside compound K}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 각질형성세포주 HaCaT에 화합물 K를 농도별로 처리한 후 히알루론산 합성효소의 발현을 mRNA 수준에서 확인하기 위하여 HAS2를 정량적 역전사 PCR한 결과이다.

도 2는 섬유아세포주 HDF에 화합물 K를 농도별로 처리한 후 히알루론산 합성효소의 발현을 mRNA 수준에서 확인하기 위하여 HAS2를 정량적 역전사 PCR한 결과이다.

도 3은 각질형성세포주 HaCaT에 화합물 K를 1 mM 농도로 처리한 후 시간대별로 HAS2를 정량적 역전사 PCR한 결과이다.

도 4는 화합물 K를 처리한 무모생쥐 피부에서의 히알루론산 생성 증가를 면역조직염색법으로 확인한 결과이다. A는 무처리군의 피부 절편을 히알루론산에 대해 면역염색한 것, B는 화합물 K를 도포한 피부 절편을 히알루론산에 대해 면역염색한 것을 각각 나타낸다. C는 A와 B의 염색정도를 정량화한 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<5> 본 발명은 진세노사이드 화합물 K로 이루어진 히알루론산 생성촉진제에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 인삼 사포닌의 주요 대사산물인 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로

토파낙사디올(화합물 K)의 효능, 즉 화합물 K가 인체 세포에 존재하는 히알루론산 합성효소(hyaluronic acid synthase, HAS) 유전자의 발현을 증가시켜 인체세포에서 히알루론산(hyaluronic acid) 생성을 촉진하는 효능이 있음을 밝히고, 이를 함유함으로써 히알루론산의 생성을 촉진하는 기능의 히알루론산 생성촉진제에 관한 것이다.

<6> 히알루론산(hyaluronic acid)은 황산기가 부착되지 않은 글루코스아미노글리칸(nonsulfated glycosaminoglycan)의 일종으로, 글루쿠로닉산과 N-아세틸글루코사민 잔기가 반복적으로 사슬 모양으로 연결되어 있는 선형의 분자량 20만~40만의 고분자물질이다. 히알루론산은 세포외기질의 주요 구성성분으로, 수분 보유, 세포간 간격 유지, 세포성장인자 및 영양성분의 저장 및 확산에 관여할 뿐만 아니라, 세포의 분열과 분화, 이동 등에도 관여하는 것으로 보고된 바 있다.

<7> 포유류의 체내에 존재하는 히알루론산의 50 % 이상이 피부, 특히 표피의 세포간 간격과 진피의 결체 조직에 분포한다고 보고되었고, 이러한 히알루론산은 주로 각질형성세포와 섬유아세포에 의해 합성되는 것으로 알려졌다. 인간의 피부에서의 히알루론산의 양은 노화와 함께 감소되는 것으로 보고되었는데, 피부에서의 히알루론산 양의 감소는 노화에 따른 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나라고 여겨지고 있다(*Biochem Biophys Acta* 279, 265-275, *Carbohydr Res* 159, 127-136, *Int J Dermatol* 33, 119-122).

<8> 한편, 인체의 관절낭(joint capsule)은 밖의 섬유층과 안쪽의 활막층으로 구성되어 있는데, 활막에서 만들어 지는 활액(synovial fluid)은 히알루론산(hyaluronate, hyaluronic acid)과 당단백질(glycoprotein)을 함유하고 있고, 이 두 성분은 관절을 윤활시키는 작용을 한다. 퇴행성 관절염이 생기면 관절내 윤활작용을 하는 히알루론산의 생성이 감소되고 단백효소에 의한 파괴가 증가되어 관절내 히알루론산이 감소하는 것이 보고되었다. 즉, 관절내 히알루론산이

감소됨에 따라 관절에서 외부 충격을 흡수하거나 분산시키지 못해 관절손상이 심해질 수 있는 것이다. 이에, 히알루론산을 관절로 주입하여 관절염을 완화시키는 방법이 1997년 미국 FDA에서 인정되어 현재 시술되고 있으나, 궁극적으로는 신체 내의 히알루론산 합성을 증가시키는 방법이 더 좋은 효과를 줄 수 있다.

<9> 피부 세포 배양 상태에서의 히알루론산의 합성은 여러 종류의 성장인자와 트랜스레티노인산, N-메틸세린 등에 의해 증가된다는 보고(*Biochem.J.* 258, 919-922, *Biochem.J.* 283, 165-170, *Biochem.J.* 307 817-821, *J. Biol. Chem.* 272, 4787-4794, *J Invest Dermatol* 92, 326-332, *Biol Pharm Bull* 17, 361-364, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12, 276-283)와, 피부에 도포된 여성호르몬 (estradiol) 및 그 유사물질이 히알루론산의 합성을 증가시킨다는 보고(*Steroids* 16, 1-3, *J Invest Dermatol* 87, 668-673, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15, 175-183)가 있으나, 히알루론산 대사에 대한 자세한 기작은 아직까지 밝혀지지 않았다. 단지, 히알루론산의 합성은 세포막의 안쪽 표면에서 히알루론산 합성효소 (hyaluronic acid synthase)에 의해 진행되며, 합성되는 동안 세포막을 뚫고 나와 세포외기질에 축적되는 것으로 알려졌다(*J. Biol. Chem.* 272, 13997-14000).

10> 포유동물에서 히알루론산 합성효소의 유전자는 서열상의 유사성이 높은 HAS1, HAS2, HAS3의 세가지 형태가 보고되었다. 이와 관련하여, 표피성장인자 (Epidermal growth factor, EGF)를 표피세포 배양액 속에 첨가하였을 때 HAS2 유전자 발현이 증가되었음이 보고된 바 있다(*J. Biol. Chem.* 276, 20428-20435). 그러나, 히알루론산의 세포 및 조직에서의 분포, 히알루론산과 관련된 각종 인자 및 효소, 예를 들면 히알루론산 합성효소 또는 히알루론산 활성을 조절하는 인자에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

- 11> 이에, 히알루론산의 상기와 같은 적용가능성에 주목하여, 히알루론산을 효과적으로 생산 및 주입하거나, 또는 인체 내의 히알루론산의 합성을 증가시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 괄목한 만한 연구결과는 아직 알려진 바가 없는 실정이다.

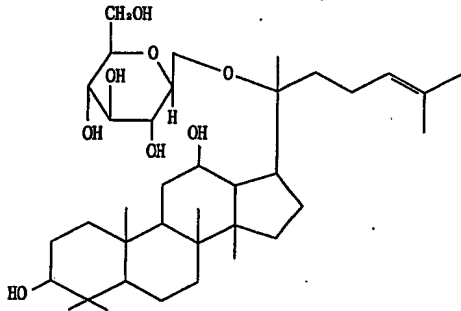
【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 12> 이에, 본 발명자들은 히알루론산을 보다 효과적으로 인체에 공급할 수 있는 방법에 대하여 꾸준히 연구한 결과, 면역증강효과, 중앙혈관신생억제효과 및 암세포침윤억제효과 등이 있는 것으로 알려진 인삼 사포닌의 주요 대사산물인 화합물 K가 상기 공지의 효능 뿐만 아니라, 인체 세포 내의 히알루론산 합성효소를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시켜 결과적으로 인체 내의 히알루론산의 생성을 촉진하는 효능이 있음을 발견하였다. 즉, 화합물 K를 인체 세포에 주입하는 경우, 히알루론산의 생성이 촉진되고 세포 내의 히알루론산의 양이 증가하므로, 히알루론산의 유용성을 이용하는 각종의 용도, 예를 들면 피부 탄력 증진, 피부 건조 방지 또는 피부 노화 방지와 같은 피부 개선용 또는 퇴행성 관절염의 치료 또는 예방과 같은 의약용으로 이용할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- 13> 따라서, 본 발명의 목적은 히알루론산 합성효소 유전자의 발현을 촉진하여 히알루론산의 생성을 촉진하는 화합물 K의 용도를 제공하는데 있다.
- 14> 본 발명의 다른 목적은 화합물 K를 유효성분으로 함유하는 히알루론산 생성촉진제를 제공하는데 있다.
- 15> 본 발명의 또다른 목적은 히알루론산 합성효소의 효능을 이용하는 각종의 용도, 예를 들면 피부 탄력 증진, 피부 건조 방지 또는 피부 노화 방지와 같은 피부 개선용 또는 퇴행성 관절염 치료 또는 예방용 등으로의 화합물 K의 이용 가능성을 제공하는데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- 16> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 면역증강효능, 종양혈관신생억제효능 및 암세포침윤억제효능이 있는 것으로 알려져 있던 화합물 K의 새로운 효능 즉, 히알루론산 합성효소(hyaluronic synthase) 유전자의 발현을 증가시키고 히알루론산의 생성을 촉진하는 효능을 제공함을 특징으로 한다.
- 17> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- 18> 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사디올(화학식 1)은 인삼 사포닌의 인체내 주요 대사산물로, 장내세균에 의해 형성되는 것으로 알려져 있다(Hasegawa,H., Sung,J.H., Matsumiya.S., Uchiyama.M.,(1996) Planta Medica 62, 453-457).

19> 【화학식 1】



- 20> 인삼 진세노사이드 유도체들은 담마란계(dammarane)의 트리테르페노이드 (triterpene)인 프로토파낙사디올과 프로토파낙사트리올에 글루코오스(glucose), 람노스(rhamnose), 아라비노스(arabinose) 또는 자일로스(xylose) 등의 당류가 에테르 결합한 화합물로서, 지금까지 고려인삼으로부터 총 29종의 진세노사이드 유도체들이 분리되었다. 총사포닌 성분은 1964년 시바타(Shibata)가 인삼에 함유된 배당체란 뜻으로 진세노사이드(ginsenoside)라 명명하였으며, 박층크로마토그래피 (TLC)에서 분리된 이동거리 순으로 올레아닌(oleanine)계 사포닌인

ginsenoside-Ro와 ginsenoside-Ra, -Rb1, -Rb2, -Rc, -Rd, -Re, -Rf, -Rg1, -Rg2, -Rg3 및 -Rh 등으로 명명하였다. 인삼 사포닌은 아글리콘에 결합되어 있는 당의 종류나 결합된 당류의 수 또는 결합 위치에 따라 약리 효능이 각각 다르다는 것이 이미 밝혀져 있으며, 인삼 중 함량이 많고 분리하기가 용이한 주요 사포닌 성분의 약리효능에 대해서는 많은 연구가 행해져 왔으나 주로 홍삼에만 존재하는 미량 사포닌이나 인체에 섭취되었을때 생성되는 대사산물 사포닌의 약리효능에 관한 연구는 상대적으로 적은 편이다.

- 21> 인삼의 사포닌 성분 중 프로토파낙사디올에 당(글루코즈)이 하나 붙은 화합물 K, 즉 20-O- β -D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사디올은 암세포증식억제작용, 종양증식억제작용, 항암제의 항암활성증대작용 등의 약리적 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근에는 사포닌의 대사물에 관한 연구가 진행되면서 인삼 사포닌의 약효는 사포닌 자체라기보다는 장내세균의 대사물이 그 활성의 본체임이 알려지고 있다(*Chem Pharm Bull* 38(10) 2859-2861, *Bio. Pharm. Bull* 25(6) 743-747).
- 22> 본 발명에서는 화합물 K를 인간 피부세포주, 즉 각질형성세포주인 HaCaT과 섬유아세포주인 HDF에 처리했을 때 HAS2 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였다. 즉, 0.01, 0.1, 1.0, 5.0 M 농도의 화합물 K를 24시간 동안 처리한 HaCaT, HDF 세포는 화합물 K를 처리하지 않은 세포에 비해 히알루론산 합성효소의 유전자 발현이 2.5 배에서 3배 정도 증가하였으며, HaCaT에 화합물 K를 1 M 농도로 처리한 후 3, 6, 12시간 경과시 약 2배 증가, 24시간 경과시 3.5 배 증가하였음을 확인하였다. 다시 말하면, 화합물 K는 인간 세포내의 히알루론산 합성효소 유전자의 발현을 촉진하는 효능이 있는 것이다.
- 23> 또한, 화합물 K를 무모생쥐에 처리했을 때 히알루론산의 생성이 증가됨을 확인하였다. 무모생쥐의 등피부에 패취를 통해 2일 동안 2회 1 %의 농도로 화합물 K를 처리한 경우 표피와 진피

에서 각각 3, 3.6 배의 히알루론산의 생성이 증가하였음을 확인하였다. 다시 말하면, 화합물 K는 인간에 주입시 조직 내의 히알루론산의 생성을 촉진하는 효능이 있는 것이다.

24> 본 발명에서 이용할 수 있는 화합물 K는 천연의 화합물 K, 또는 공지의 제조방법에 의하여 인공적으로 제조된 화합물 K를 제한없이 사용할 수 있다. 화합물 K의 수득방법으로는 예를 들면, 인삼으로부터 제조된 정제 사포닌을 물이나 완충용액과 같은 수성용매 또는 물이나 완충용액과 같은 수성용매와 유기용매의 혼합액에 용해시킨 후, 페니실리움속에서 분리한 나린지나제 및 아스퍼질러스속에서 분리한 펙티나제 중 적어도 하나와 반응시킴으로써 화합물 K를 획득하는 방법을 들 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

25> 본 발명에 따라 히알루론산 합성효소 유전자의 발현을 증가시키고 히알루론산의 생성을 촉진하는 효능이 있는 것으로 밝혀진 화합물 K는 히알루론산의 유용성을 이용하는 각종 피부 외용제의 유효성분으로 사용할 수 있다. 예를 들면, 피부 탄력 증진, 피부 건조의 방지 또는 피부 노화의 방지 등을 위한 피부 외용제에 첨가할 수 있다. 또한, 히알루론산을 투여함으로써 질병, 예를 들면 퇴행성 관절염과 같은 질병을 치료 또는 예방하기 위한 약제에도 첨가할 수 있다. 그러나, 이에 한정하는 것은 아니다.

26> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나, 본 발명의 권리 범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니고, 당 업계에 알려진 공지의 기술을 적용한 변형 또한 본 발명의 권리범위에 포함되는 것이다.

27> [실시예 1] 화합물 K에 의한 인간 피부세포주 HaCaT에서의 HAS2 발현 증가

28> 제 1단계. 세포주와 세포 배양

29> 인체 각질형성세포주(human keratinocyte)인 HaCaT 또는 인체 섬유아세포주 (human fibroblast)인 HDF를 10% 우혈청(fetal bovin serum)을 포함한 DMEM 배지 (Dulbeccos modified Eagles Medium, Gibco 1210-0038)에서 배양하였다. 배양은 모두 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 수행하였다.

30> 제 2단계. 정량적인 역전사 PCR을 통한 HAS2의 mRNA 합성 증가의 확인

31> 상기 제 1단계에서 배양된 세포주를 각각 트립신 처리하여 단일세포 현탁액을 만들고, T75 플라스크에 1 x 10⁶개씩 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후, 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지를 처리하여 24시간 동안 배양한 다음, 역시 우혈청이 포함되지 않은 배지에 0.01, 0.1, 1.0, 5.0 μ M 농도의 화합물 K를 녹여 처리하였다. 24시간 경과 후 세포를 회수하여 냉각된 인산완충용액(PBS)으로 세척하고, TRIzol™ reagent(Life Technologies, Inc.) 1 ml을 첨가하여 총 RNA를 추출하여 하기의 방법은 정량적인 역전사 PCR을 수행하였다. 또한, 각질형성세포주 HaCaT에 화합물 K를 1 mM 농도로 처리한 후 3시간, 6시간, 12시간, 24시간 경과 시점에서 세포를 회수하여 동일한 실험법에 따라 PCR을 수행하였다. HAS2 및 GAPDH의 PCR 수행을 위한 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.

32> 【표 1】

정량적인 역전사 PCR 반응을 위한 HAS2와 GAPDH의 프라이머

프라이머 이름	서열
HAS-2 forward primer	5-TTCCTTTATGTGACTCATCTGTCTCACCGG-3
HAS-2 reverse Primer	5-ATTGTTGGCTACCAGTTTATCCAAAGGG-3
GAPDH forward primer	5-CAACTACATGGTTTACATGTTCC-3
GAPDH reverse primer	5-GGACTGTGGTCATGAGTCCT-3

33> 총 RNA 4 g을 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, 10 mM dNTP, 40 units/ μ l RNase inhibitor의 역전사 반응 완충액 25 μ l에 넣고, 0.5 μ g/ μ l oligo (dT)₁₆의 프라이머와 200 units SuperScript II(GiboBRL)의 역전사 중합효소를 첨가하여 42 °C에서 1시간 반응시켰다. 이후 역전사 반응 용액 2.5 μ l를 50 mM KCl, 10 mM tris-HCl(pH 8.3), 5 mM MgCl₂, 100 M dNTP의 PCR 반응 완충액 50 μ l에 섞고, 10 μ M의 프라이머와 0.5 U의 Taq DNA 중합효소를 첨가하여 95 °C 에서 30초, 60 °C에서 30초, 72 °C에서 30 초의 30 사이클을 수행하였다. PCR 결과를 아가로스 겔에 전기영동하고 이를 스캐닝한 후 ImageMaster 2D Elite (Amersham Bioscience) 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석하였다.

34> 도 1A 및 도 2A는 HaCaT 및 HDF 각각의 전기영동 결과를 촬영한 사진이다. 도 1B 및 도 2B는 HaCaT 및 HDF에 처리한 화합물 K의 농도에 따른 HAS2 유전자의 발현정도를 GAPDH의 발현량에 대한 상대적인 값으로 구하여 그래프로 나타낸 것이다. GAPDH는 유전자 발현 변화를 정량적 역전사 PCR 방법으로 확인할 때 내부 지표 유전자(internal control)로 사용하는 유전자로서, GAPDH의 변화에 대한 특정 유전자, 여기에서는 HAS2의 상대적 양을 나타냄으로써 시료간의 표준화를 이룰 수 있다. 결과를 살펴보면, 화합물 K의 농도가 0.01 에서 1.0 mM 사이일 때 HAS2 의 mRNA 양은 2.5배에서 3배 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 처리 후 시간의 경과에 따른 HAS2 유전자의 발현은 GAPDH에 대하여 상대적으로 증가하는 것으로 나타났다(도 3).

35> [실시예 2] 화합물 K에 의한 무모생쥐 피부에서의 히알루론산 생성 증가

36> 제 1단계. 무모생쥐

- 37> 본 실험을 위한 생쥐로는 체중이 25~39 g 정도 되는 30주령의 암컷 무모 생쥐(hairless mouse; Skh:HR-1)를 Charles River Laboratories(Wilmington, MA, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. 실험쥐들을 일주일동안 동물사육실에서 적응시킨 후 그룹 당 5마리씩 정상군, 치료 처치군으로 나누어 실험기간동안 사육하였다. 온도 23.2 °C, 습도 55.10%의 조건에서 사육하였으며, 명암은 12시간 주기로 조명하였다. 그 외 실험기간동안 먹이와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.
- 38> 제 2단계. 화합물 K의 처치 및 히알루론산 결합 단백질을 이용한 조직면역염색
- 39> 1% 농도로 용매(1.3 BG:에탄올 = 7:3)에 녹인 화합물 K를 제 1단계에서의 치료처치군에 패취의 형태로 2일간 2회 처치하였고, 대조군의 경우 용매만 동일량을 같은 방법으로 처치하였다. 조직의 준비를 위해 동물을 희생시킨 후 등쪽 피부를 떼어내어 filter paper에 편평하게 부착한 후 10% 중성 포르말린에 고정시키고 파라핀에 임베드하여 얇은 절편으로 잘랐다. 파라핀 제거 후 각 절편은 메탄올에 희석된 0.3 % 과산화수소 용액에 담구어 30분간 방치하고, 인산완충 용액으로 씻은 후 1 %의 우혈청알부민을 처리하였다. 피부조직내 히알루론산의 양을 측정하기 위하여 바이오틴이 결합된 히알루론산 결합단백질을 1 mg/ml 농도로 처리하여 4 °C에서 12시간 방치한 후, 스트렙트아비딘이 결합된 퍼옥시다제를 1/300 농도로 30분간 상온에서 처리하였고, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride reagent를 5분간 상온에서 처리하여 발색시켰다. 그 외 일반적인 조직상태 관찰을 위하여 헤마톡실린 (Hematoxylin) 염색을 실시하였다. 면역염색된 히알루론산은 Image Pro(Media Cybernetics) 이미지 분석프로그램을 이용하여 정량화하였다.

<40> 그 결과를 도 4에 나타내었다. 용매만을 처리한 무처리군에 비하여, 화합물 K를 처리한 군의 피부 절편에서의 히알루론산의 양이 표피에서는 약 3배 정도, 진피에서는 약 3.6배 정도 증가한 것을 알 수 있다.

<41> 이상의 결과를 통하여, 화합물 K를 피부세포에 처리하였을 때 히알루론산 합성효소 유전자 HAS2의 발현이 증가되어 결과적으로 피부의 표피 및 진피에서 히알루론산의 생성이 촉진됨을 확인할 수 있다.

【발명의 효과】

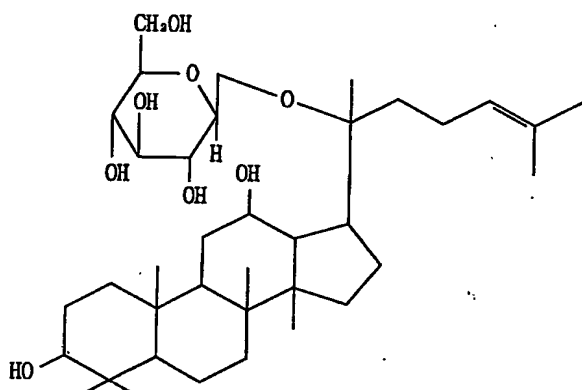
<42> 이상에서 설명한 바와 같이, 인삼 사포닌의 주요대사산물인 화합물 K는 인체 세포 내의 히알루론산 합성효소를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 효능이 있어 인체에 적용하였을 때 히알루론산의 생성 작용을 활성화시키는 뛰어난 효과가 있다. 따라서, 화합물 K는 피부의 탄력 저하, 수분 함유량 감소 및 노화의 진행을 효과적으로 방지 및 예방하는데 이용할 수 있으며, 아울러 히알루론산을 치료용으로 적용하는 퇴행성 관절염의 예방 및 치료를 위해서도 효과적으로 이용할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 화학식 1로 표현되는 화학식 K(20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사디올)로 이루어진 히알루론산 생성촉진제.

[화학식 1]



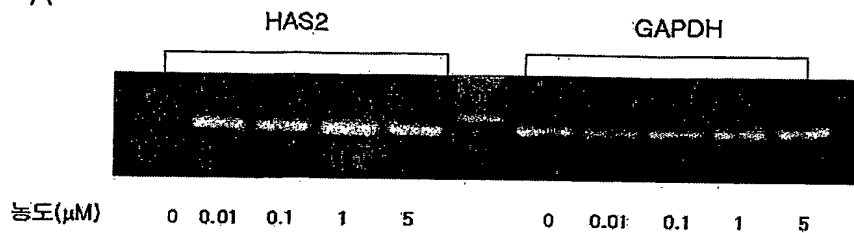
【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 히알루론산 생성촉진 기능은 히알루론산 합성 효소 유전자의 발현을 증가시키는 작용으로부터 기인하는 것임을 특징으로 하는 히알루론산 생성촉진제.

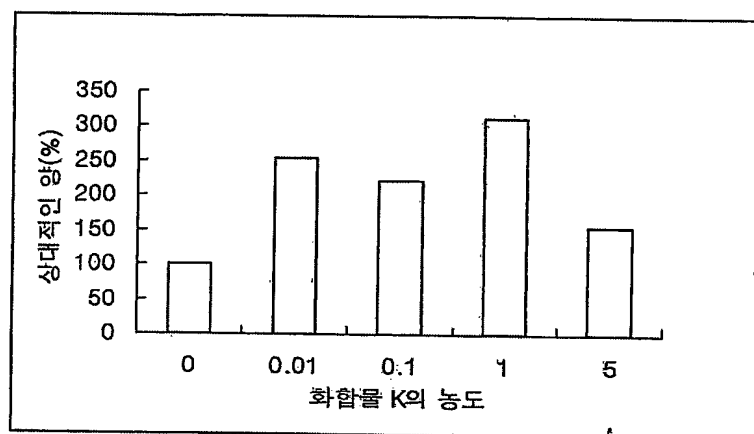
【도면】

【도 1】

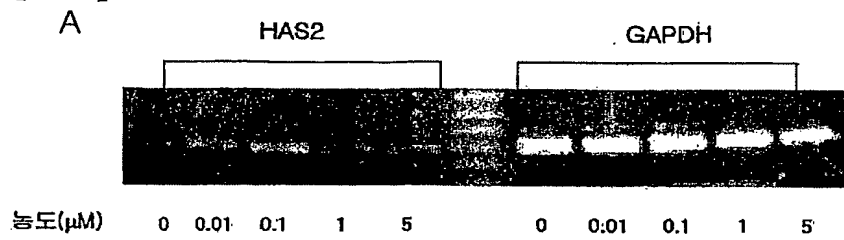
A



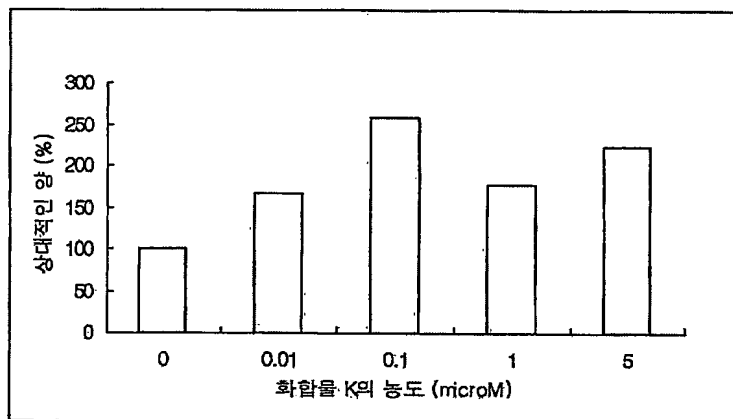
B



【도 2】

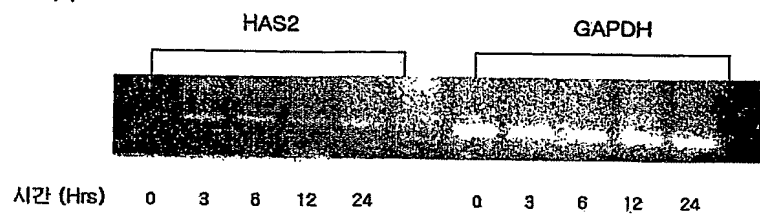


B

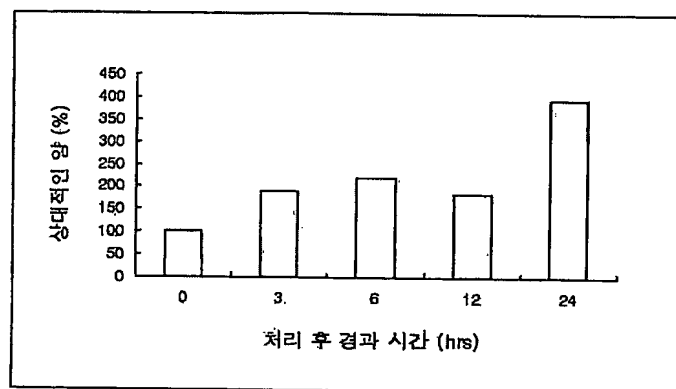


【도 3】

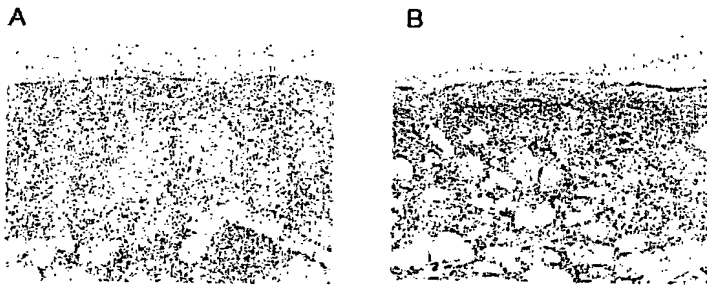
A



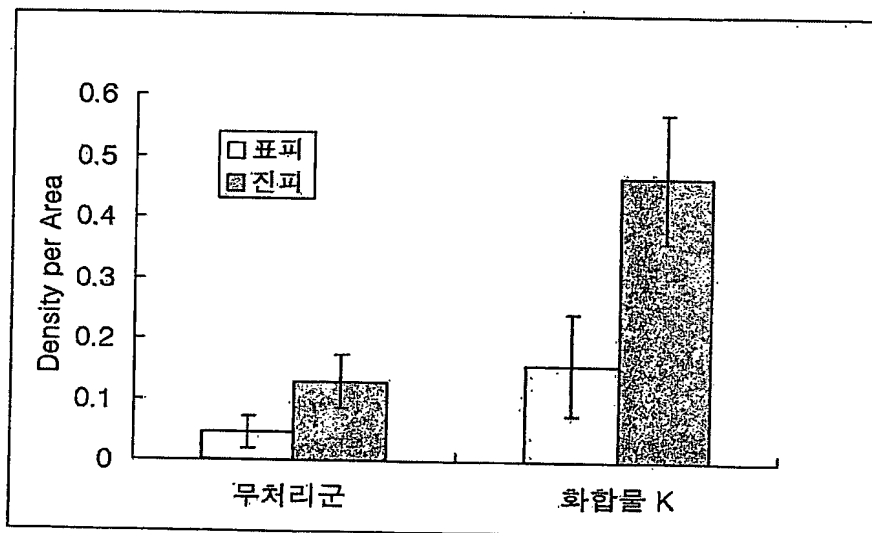
B



【도 4】



C.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.